

Attorney's Docket No.: 06501-056001 / C2-905DP1PCT-US

03CO

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Shin-ichi Funahashi et al. Art Unit : Unknown  
Serial No. : 09/502,698 Examiner : Unknown  
Filed : February 11, 2000  
Title : PROTEIN HAVING PDZ DOMAIN SEQUENCE

Commissioner of Patents  
Washington, D.C. 20231

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC §119 from PCT Application No. PCT/JP98/03603 filed August 12, 1998 which claims priority from Japanese Patent Application Nos. 9/230356, filed August 12, 1997, and 10/189944, filed June 18, 1998. Certified copies of the Japanese applications from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: 4-27-00

John T. Li  
John T. Li  
Reg. No. 44,210

Fish & Richardson P.C.  
225 Franklin Street  
Boston, MA 02110-2804  
Telephone: (617) 542-5070  
Facsimile: (617) 542-8906

20078766.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner of Patents, Washington, D.C. 20231.

April 27, 2000

Date of Deposit

Jeanine Mecherkany  
Signature

Jeanine Mecherkany

Typed or Printed Name of Person Signing Certificate

日本特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1997年 8月12日

出願番号

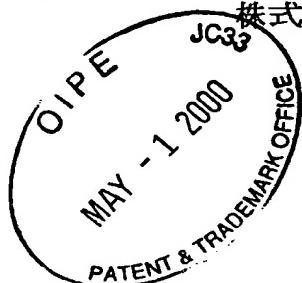
Application Number:

平成 9年特許願第230356号

出願人

Applicant(s):

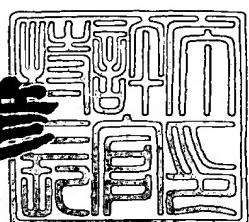
株式会社中外分子医学研究所



2000年 3月10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3012588

【書類名】 特許願  
【整理番号】 C2-905  
【提出日】 平成 9年 8月12日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/12  
【発明の名称】 P D Z ドメイン配列を有するタンパク質  
【請求項の数】 15  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 153番地2 株式会社中外分子医学研究所内  
【氏名】 舟橋 真一  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 153番地2 株式会社中外分子医学研究所内  
【氏名】 宮田 昌二  
【特許出願人】  
【識別番号】 596102791  
【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所  
【代表者】 川口 勉  
【代理人】  
【識別番号】 100102978  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 清水 初志  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 041092  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1

特平 9-230356

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710621

【書類名】 明細書

【発明の名称】 PDZドメイン配列を有するタンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：1に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、もしくは付加したアミノ酸配列からなりPDZドメイン配列を有するタンパク質。

【請求項 2】 ①請求項 1に記載のタンパク質と、②少なくとも1つの抗体認識部位を含むタンパク質もしくはペプチド、からなる融合タンパク質。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項 4】 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNA。

【請求項 5】 請求項 3 に記載のDNAを含むベクター。

【請求項 6】 請求項 3 に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。

【請求項 7】 請求項 6 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質の生産方法。

【請求項 8】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に被検タンパク質を接触させ、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合するタンパク質を選択する工程を含む、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニング方法。

【請求項 9】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に被検遺伝子の遺伝子産物を接触させ、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合する遺伝子産物に対応する遺伝子を選択する工程を含む、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニング方法。

【請求項 10】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合するタンパク質。

【請求項 11】 請求項 8 に記載の方法により単離しうる、請求項 10 に記載のタンパク質。

【請求項 12】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質に結合するタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 13】 請求項 9 に記載の方法により単離しうる、請求項 12 に記載の遺伝子。

【請求項 14】 請求項 1 に記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項 15】 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する抗体。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は、PDZドメイン配列を有する新規なタンパク質およびその遺伝子に関する。

##### 【0002】

##### 【従来の技術】

PDZドメインを有するタンパク質としては、これまで PSD-95、hDlg、Z0-1、p55、Dsh、LIN-7、InaD、PTPL1/FAP1などが知られており、これらはPDZファミリーなどと呼ばれている。最初、95kDa後シナプス膜タンパク質 (post-synaptic density protein) PSD-95において、保存された「Gly-Leu-Gly-Phe(GLGF)」の4アミノ酸のモチーフを含む約80乃至90アミノ酸からなる3回の繰り返し構造が存在することが同定された(Neuron 9, 929-942 (1992))。その後、このドメイン構造がショウジョウバエの致死(1)ディスクス ラージー1 癌抑制タンパク質DlgA (Drosophila lethal(1) discs large-1 tumor suppressor protein DlgA) (Cell 66, 451-464 (1991))、密着結合タンパク質Z0-1 (tight junction protein ZO-1) (J. Cell Biol. 121, 491-502 (1993))のタンパク質にも見つかり、この繰り返し配列は、PSD95、DlgA、Z0-1の頭文字をとって「PDZドメイン」と名付けられた(GLGFリピートやDHR (DlgA homology region) ドメインとも呼ばれる)。PDZドメインを有するタンパク質は、このPDZドメインの配列を介して他のタンパク質と結合することが知られており、例えば、PSD-95タンパク質はNMDA受容体2B(Kornau, H.-C., et al. (1995) Science 269, 1737-1740)、シェーカー型カリウムイオンチャネル (Shaker-type K<sup>+</sup> channel) (Kim, E. et al. (1995) Nature 378, 85-88)と結合することが知られている。hDlgタンパク質は家族性大腸腺腫症遺

伝子/APC (adenomatous polyposis coli tumor suppressor gene/APC) のコードするタンパク質と(Matsumine et al. (1996) *Science* 272, 1020-1023)、Dshタンパク質はNotchタンパク質と(Axelrod, J.D., et al. (1996) *Science* 271, 1826-1832)、直接結合することが報告されている。また、InaDタンパク質はショウジョウバエの視覚シグナル伝達カスケード (*Drosophila visual signal transduction cascade*) で機能している  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルタンパク質であるTRPと結合することが報告されている(Shieh, B-H. and Zhu, M. Y. (1996) *Neuron* 16, 991-998)。PDZドメインを有するタンパク質の構造としては、このドメインを1つ有するタンパク質(p55、Dsh)、2つ有するもの(SIP-1: J. Yanagisawa et al. *J. Biol. Chem.* 272, 7167-7172 (1997))、3つ有するもの(PSD-95、hDlg)、5つ有するもの(InaD、PTPL1/FAP1)、7つ有するもの(GRIP: H. Dong et al. (1997) *Nature* 386, 279-284)などがあり、多様である。また、最近マウスにおいてタンパク質中のN末端側のペプチドをコードする領域が欠落した遺伝子で、この不完全な遺伝子領域において4つPDZドメインを有するペプチドをコードする遺伝子が報告された (GeneBank 1997年5月18日登録, Accession number AF000168)。PDZドメインを有するタンパク質群は、共通して、C末に存在する「Thr/Ser-Xaa-Val」(Xaaは任意のアミノ酸残基)に代表される3から4アミノ酸からなる疎水性アミノ酸の領域を持った他のタンパク質と結合していることが知られている。それらのタンパク質の多くは膜貫通型のタンパク質であり、細胞内でのシグナル伝達の機能をはたしていることが予想される(TIBS 21, 455-458 (1996)、J. Yanagisawa et al. (1997) *J.Biol. Chem.* 272, 7167-7172)。このためPDZドメインを有するタンパク質やこれと相互作用するタンパク質は、神経伝達系、アポトーシス、癌化などに関与しており、医薬品開発の標的として近年注目を集めている。

#### 【0003】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、PDZドメイン配列を有する新規なタンパク質、および該タンパク質をコードするDNAを提供することを課題とする。

#### 【0004】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ヒト臍帯血管内皮細胞のTNF $\alpha$ による遺伝子発現の変化を解析していく過程において、TNF $\alpha$ の刺激により発現が上昇した遺伝子を単離し、該遺伝子をプローブとしてスクリーニングを行ったところ、新規なタンパク質をコードする遺伝子を単離するに至った。本発明者等は単離した遺伝子がコードするタンパク質につき解析を行ったところ、該タンパク質が、その分子内にタンパク質-タンパク質相互作用に重要な役割を果たしているPDZドメイン配列を有していることを見出した。

#### 【0005】

即ち、本発明は、分子内にPDZドメイン配列を有する新規なタンパク質およびその遺伝子に関し、より具体的には、

- (1) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、もしくは付加したアミノ酸配列からなりPDZドメイン配列を有するタンパク質、
- (2) ①(1)に記載のタンパク質と、②少なくとも1つの抗体認識部位を含むタンパク質もしくはペプチド、からなる融合タンパク質、
- (3) (1)または(2)に記載のタンパク質をコードするDNA、
- (4) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNA、
- (5) (3)に記載のDNAを含むベクター、
- (6) (3)に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、
- (7) (6)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1)または(2)に記載のタンパク質の生産方法、
- (8) (1)または(2)に記載のタンパク質に被検タンパク質を接触させ、(1)または(2)に記載のタンパク質に結合するタンパク質を選択する工程を含む、(1)または(2)に記載のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニング方法、
- (9) (1)または(2)に記載のタンパク質に被検遺伝子の遺伝子産物を接触させ、(1)または(2)に記載のタンパク質に結合する遺伝子産物に対応する遺伝子を選択する工程を含む、(1)または(2)に記載のタンパク質に結合

するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニング方法、

(10) (1) または (2) に記載のタンパク質に結合するタンパク質、

(11) (8) に記載の方法により単離しうる、(10) に記載のタンパク質

(12) (1) または (2) に記載のタンパク質に結合するタンパク質をコードする遺伝子、

(13) (9) に記載の方法により単離しうる、(12) に記載の遺伝子、

(14) (1) に記載のタンパク質に結合する抗体、

(15) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する抗体、

に関する。

#### 【0006】

なお、本発明において「PDZドメイン配列」とは、「Gly-Leu-Gly-Phe」またはその類似アミノ酸からなる4アミノ酸のモチーフを含む約80乃至90アミノ酸からなる配列を指す(TIBS 20,p102-103(1995)参照)。

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、PDZドメイン配列を有する新規なタンパク質に関する。本発明のタンパク質に含まれる配列番号：1 に記載のタンパク質は、アミノ酸配列中の43～122位（配列番号：4）、176～253位（配列番号：5）、322～401位（配列番号：6）、418～496位（配列番号：7）、555～637位（配列番号：8）、680～761位（配列番号：9）にPDZドメイン配列を有し、他のPDZドメイン保持タンパク質と同様、このPDZドメインを介して他のタンパク質と相互作用すると考えられる。配列番号：1 に記載のタンパク質はヒト由来のタンパク質であるため、ヒトにおける治療において特に有用である。即ち、他の生物（例えば、マウス）由来のタンパク質では、ヒトの治療に応用する際に免疫原性の点で抗体が派生して治療効果が低減したり、無効になったり、血清病やアナフィラキシーショックを生じるなどの重大な副作用が生じるおそれがあるため、ヒトの治療の材料としては、特に、ヒト由来のタンパク質であることが望ましい。

## 【0008】

本発明のタンパク質は、天然のタンパク質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することが可能である。天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、後述する本発明のタンパク質に対する抗体を適当な担体に結合させたアフィニティーカラムにより、ヒトのさい帯血内皮細胞（HUVEC）などから単離することが可能である。アフィニティーカラムの作製については、例えば、Wilchekらの方法（Wilchek et al. *Methods Enzymol.* 104, p.3-55(1984)）に従って行うことが可能である。一方、組換えタンパク質であれば、後述の本発明のタンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。

## 【0009】

また、当業者であれば、公知の方法を用いて配列番号：1に記載のタンパク質中のアミノ酸の置換などを適宜行い、配列番号：1に記載のタンパク質と実質的に同一のタンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加などにより配列番号：1に記載のタンパク質に対してアミノ酸配列が改変された改変体であって、PDZドメイン配列を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、Kunkelらの方法（*Methods Enzymol.*, 85, p2763-2766(1988)）やPCR（polymerase chain reaction反応）を利用した方法などがある。Kunkel法では、鑄型となる1本鎖DNAを調製する際に、宿主としてdut<sup>-</sup>、ung<sup>-</sup>の大腸菌を利用することでウラシルを取り込ませる。このウラシルを含む鑄型に導入したい変異を含むプライマーをアニーリングさせ、通常のDNA合成をin vitroで行う。これにより調製したウラシルを含むDNA鎖との二本鎖DNAを、通常の大腸菌に取り込ませると、ウラシルを含んだDNA鎖は壊され、変異の入ったDNA鎖が鑄型となってDNA合成が行われる。この結果、非常に効率的に変異の導入されたDNAを得ることができる。一方、PCRを利用した変異の導入は、例えば、適当な制限酵素の認識部位を中心に含む領域を標的にして変異を導入したい部分の配列を含むプライマーと制限酵素の認識部位またはその外側の配列を含むプライマーを2種類作製してPCRを行い、そのPCR産物を混

合した後に2つの制限酵素の認識部位またはその外側の配列を含むプライマーでDNAを増幅し、その中に変異を導入した領域が含まれるように適当な制限酵素で消化し、もとのDNAの当該領域に入れ替えることで変異が導入できる (Saiki et al .1988 Science 239,p487-491;Current Protocol in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-interscience出版, Unit8.5.1-8.5.10(1997)

、実験医学別冊 新遺伝子工学ハンドブック,羊土社,p251-261)。なお、アミノ酸の置換は、通常、10アミノ酸以内であり、好ましくは6アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。また、置換、欠失、付加がなされる部位は本発明のタンパク質の活性が保持される限り特に制限はない。好ましくはPDZドメイン配列以外の領域であるが、本発明のタンパク質の活性が保持される限りPDZドメイン配列であってもよい。改変されたタンパク質は、少なくとも1つのPDZドメイン配列を有し、好ましくは2つのPDZドメイン配列を有し、さらに好ましくは4つのPDZドメイン配列を有し、さらに好ましくは6つのPDZドメイン配列を有する。

#### 【0010】

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のタンパク質をコードするDNAは、cDNAでも、ゲノムDNAでもよく、また合成DNAであってもよい。本発明のDNAは、例えば、本発明のタンパク質を組換えタンパク質として生産するために利用しうる。即ち、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：2に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させタンパク質を精製することにより本発明のタンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。

#### 【0011】

組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、動物細胞としてはCH0細胞(Chinese hamster ovary cell)、COS細胞(サルCV-1纖維芽細胞を複製起点を欠いたSV40ウイルスでトランスフォームした細胞株)、マウスNIH3T3細胞、ヒトHeLa細胞、ヒトリンパ球系のナマルバ細胞などが挙げられるが、これらに限らない (Current Protocol in Molecular Biology, Greene Publishing Associates

and Wiley-Interscience, Unit 16.12-16.14(1991)）。ベクターとしては、pSV2neoやpcDNA1, pCD8, pRcRSV, pREP4, pCEP4 (Invitrogen社製)、pMAM, pMAMneo (CLONTECH社製)、pCI-neo mammalian expression vector, pSI-neo mammalian expression vector, pTARGET<sup>TM</sup> mammalian expression vector (Promega社製)などが好適に用いられる。プラスミドベクターに限らず、組み換えウイルスを作製して組み換えタンパク質の生産に用いることもできる。pAdexベクターを用いた組み換えアデノウイルス（実験医学別冊 新遺伝子工学ハンドブック、羊土社、p238-2 44）、LNやLXSNベクターシリーズ、その改変型pBabeベクターシリーズ、MFGベクターなどを用いた組み換えレトロウイルス（実験医学別冊 新遺伝子工学ハンドブック、羊土社、p245-250、Current Protocol in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-interscience出版, Unit 9.10.1-9.14.3(1992)）、シンドビスウイルス、ワクシニアウイルス（Current Protocol in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-interscience出版, Unit 16.15.1-16.19.9(1992)）などによっても組み換えタンパク質の生産を行うことができる。バキュロウイルスを利用した組み換えタンパク質の生産も可能であり、カイコの幼虫、またSF21, SF9, High Five<sup>TM</sup>細胞などの培養細胞株を宿主として利用することもできる（実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ7 分子生物研究のためのタンパク実験法、羊土社, p167-171(1994)、O'Reilly, D.R. et al.: Baculovirus expression vectors, A laboratory Manual, Oxford University Press(1992)）。バキュロウイルス発現ベクターとしてはpBacPAK8, 9, pBacPAK-His1/2/3やpAcUW31 (CLONTECH社製)、pBlueBac (Invitrogen社製)、pBAC, pBACgus (Novagen社製)などが挙げられる。

### 【0012】

タンパク質を効率よく発現させるために、動物細胞において用いられるプロモーターとしては、例えば、SV40初期プロモーター(Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London, p.83-141(1982))、EF-1 $\alpha$ プロモーター(Kimら Gene 91, p.217-223 (1990))、CAGプロモーター(Niwa e t al. Gene 108, p.193-200 (1991))、RSV LTRプロモーター(Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987))、SR $\alpha$ プロモーター(Takebe et al. Mol. C

ell. Biol. 8, p.466 (1988))、CMV初期プロモーター (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987))、SV40後期プロモーター (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982))、アデノウイルス後期プロモーター (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989))、HSV TKプロモーターや誘導的発現プロモーターが挙げられる。誘導的発現プロモーターとしては、例えば、グルココルチコイドで誘導されるMMTVプロモーターやホルボールエステルや重金属で誘導されるMT (メタロチオネイン) IIプロモーター、テトラサイクリンでオン／オフが可能なTet-On/off system (CLONTECH社製)、エクジソンで誘導できる発現システム (Invitrogen社製) やIPTGで誘導発現を行うLac Switch System (Stratagene社製) などが好適である。

#### 【0013】

また、酵母細胞でもタンパク質の生産が可能である。プロテアーゼ欠損株であるBJ2168, BJ926, CB023や分泌ベクター用の酵母株20B-12などが宿主として利用できる（実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現解析法, 羊土社, p166-176(1994)）。発現ベクターとしては、例えば、pYEUra3 (CLONTECH社製)、pYEX<sup>TM</sup>-BX, pYEX<sup>TM</sup>-S1が挙げられる。分裂酵母の発現ベクターpESP-1 (Stratagene社製) を用いて分裂酵母SP-Q01株で発現することも可能である。酵母細胞においてタンパク質を効率的に発現させるためのプロモーターとしては、構成的に発現させるPGKプロモーター、ADH1プロモーター、銅イオンで誘導できるCUP1プロモーター、ガラクトースにより誘導されグルコースにより抑制されるGal1-Gal10プロモーター、リン酸濃度の低下により誘導され高リン酸濃度により抑制されるPH05プロモーターなどが好適に用いられる。分裂酵母ではnmt1プロモーターなどが好適に用いられる。

#### 【0014】

大腸菌による組み換えタンパク質の生産には、大きく4種類の発現プロモーターが使用できる。 $\lambda$  PLプロモーターはclts857リプレッサーにより発現が調節され、熱ショックにより発現が誘導される。宿主としてはN4830-1, M5219が挙げられ、pPL-lambda, pKC30, pRIT2Tなどのベクターにより発現できる。tacプロモーターはlacI<sup>q</sup>リプレッサーにより発現が調節され、イソプロピルβ-D-チオガラクト

シド(IPTG)の添加により発現が誘導される。宿主としてはJM105,XL1-Blueが挙げられ、pDR540,pKK233-3,pGEX-3X,pMAL-c2などのベクターにより発現することができる。trpプロモーターはtrpリプレッサーにより発現が制御され、βインドールアクリル酸(IAA)の添加により発現が誘導される。宿主としてはHB101などを使用できる。pBTrp2などのベクターにより発現することができる。T7ファージプロモーターはT7RNAポリメラーゼによってのみ認識され発現できるため、例えば、λファージDE3のint遺伝子内にlacI遺伝子、lacUV5プロモーターの支配下のT7 RNAポリメラーゼ遺伝子を含むDNA断片が挿入されていて、これを大腸菌BL21株に溶原化させたBL21(DE3)株が宿主として使用でき、IPTGの添加によりT7RNAポリメラーゼが誘導されて、T7プロモーターからの誘導発現が可能になる。ベクターとしてはpET-3c,pET-8cなどが使用できる。基底レベルのT7RNAポリメラーゼを抑制するために、T7RNAポリメラーゼに結合して転写を阻害する天然の阻害剤であるT7リソチームを供給するプラスミドを共存させたBL21(DE3)pLysSも宿主として使用できる。T7プロモーターの転写開始点の下流にlacオペレーター配列を挿入したT7lacプロモーターを持つpET-11c,pET-11dなども発現ベクターとして挙げられる(F.Studier et al.:J.Mol.Biol.189,p113-130(1996)、F.Studier et al.:Methods Enzymol.185,p60-8(1990))。

#### 【0015】

宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、エレクトロポレーション法(Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987))、リン酸カルシウム法(Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987))、DEAEデキストラン法(Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643 (1985))、リボフェクチン法(Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. Science 259, 230-234 (1993))等の方法により行うことができるがいずれの方法によってもよい。

#### 【0016】

得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、逆相クロマトグラ

フィー、ハイドロキシアパタイト、水素結合クロマトグラフィー、キレートカラムにより精製することができる (Deutscher,M.P.ed.:Methods Enzymol.182,Guide to Protein Purification,1990, Principles and Methodsシリーズ:Gel Filtration,Ion Exchange Chromatography,Affinity Chromatography,Pharmacia社製)。また、後述するように本発明のタンパク質に対する抗体を調製すれば、その抗体を用いたアフィニティーコロマトグラフィーによりタンパク質を高い精製度で精製することが可能である。

#### 【0017】

また、当業者であれば、調製した本発明のタンパク質を用いてこれに結合する抗体を調製することも容易に行いうる。本発明の抗体は、本発明の遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターにて発現し、精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することにより得ることができる。また、本発明の遺伝子がコードするタンパク質の適当な領域をペプチド合成し、これを上記の動物に免疫することによってもこの遺伝子産物に対する抗体を得ることができる。また、モノクローナル抗体の作成方法としては、マウスやラットのハイブリドーマを確立する方法が挙げられる (Kohler and Milstein,Nature 256,p495-497(1975))。具体的には、調製した本発明のタンパク質をマウス、ラット、アルメニアンハムスターに免疫した後、抗体産生細胞を脾臓またはリンパ節より取り出し、*in vitro*でミエローマ細胞と融合させて、抗原を用いたスクリーニングを行いクローンを選択する (Harlow,E, and Lane,D.:Antibodies:A laboratory manual.Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,New York(1988))。マウスミエローマ細胞としては、p3-x63-Ag8-U1(P3-U1),P3-NS1/1-Ag4-1(NS-1),SP2/0-Ag14(AP2/0)が、ラットミエローマ細胞としては、YB2/3HL,P2G11.16Ag20(YB2/0)が挙げられる。細胞の融合はポリエチレングリコールや電気パルスを用いて行うことが可能である。ハイブリドーマを培養した培養上清に含まれるモノクローナル抗体や得られたハイブリドーマを大量培養して免疫抑制剤で処理したマウスの腹腔に注射し、マウスの腹水中に含まれるモノクローナル抗体は、例えば、Protein A-sepharose (Pharmacia社製) により精製することができる。さらには、本発明のタンパク質を固定したアフィニティーカラムによっても精製することができ

る (Harlow,E.and Lane,D.:Antibodies:A laboratory manual.Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,New York(1988))。

#### 【0018】

得られた抗体を人体に投与する場合には、免疫原性を低下させるために、ヒト抗体またはヒト型化抗体を用いると有効である。抗体をヒト型化する方法としては、モノクローナル抗体生産細胞から抗体遺伝子をクローニングし、その抗原決定部分を既存のヒト抗体に移植するCDR graft法 (In immunology Methods Manual, p98-107, Academic Press) が挙げられる。またヒト抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウスに免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様に作成することができる。ヒトB細胞ハイブリドーマ法 (Kozbor et al. Immunology Today 4, p72(1983))、エプシュタインバールウイルス (EBV) -ハイブリドーマ法 (Cole et al. in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Ala R. Liss, Inc. p77-96(1985))などによってもヒトモノクローナル抗体を作製できる。

#### 【0019】

これにより得られた抗体は、本発明のタンパク質の検出や抗体治療に用いることができるだけでなく、後述する本発明のタンパク質に相互作用するタンパク質のスクリーニングに用いることが可能である。

#### 【0020】

また、本発明は、本発明のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニング法に関する。本発明のタンパク質のようにPDZドメインを有するタンパク質群は、共通して、C末に存在する「Thr/Ser-Xaa-Val」(Xaaは任意のアミノ酸残基)に代表される3から4アミノ酸からなる疎水性アミノ酸の領域を持った他のタンパク質と相互作用していることが知られている。それらのタンパク質の多くは膜貫通型のタンパク質であり、細胞内でのシグナル伝達の機能をはたしていることが予想される (TIBS 21, 455-458 (1996)、 J. Yanagisawa et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 7167-7172)。このスクリーニング方法においては、本発明のタンパク質に被検タンパク質を接触させ、本発明のタンパク質に結合するタンパク質を選択する工程を含む。被検タンパク質は、例えば、目的のタンパク質を含むことが予想される細胞や組織由来の溶解液として本発明のタンパク質に接触させる。

## 【0021】

具体的な方法の一例として免疫沈降法が挙げられる。免疫沈降法は、タンパク質とタンパク質との結合を検出するために用いられる最も一般的な方法である。免疫沈降は、通常、本発明のタンパク質に細胞や組織由来の溶解液、例えば、ヒトさい帯内皮細胞などの細胞をTriron X-100やデオキシコール酸ナトリウムなどで溶解した細胞溶解液などの生物学的試料を接触させ、これにより形成される本発明のタンパク質とこれに結合するタンパク質からなる複合体に、抗体を作用させて免疫複合体を形成させ、これを沈降させるという手法による（実験医学別冊新遺伝子工学ハンドブック、羊土社、p304-308(1996)）。

## 【0022】

免疫複合体の沈降は、例えば、抗体がマウス IgG 抗体であれば、プロテインAセファロースやプロテインGセファロースを用いて行うことができる。これらの一般的な方法については例えば、「Harlow,E. and Lane, D.: Antibodies, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)」の方法に従えばよい。また、他の動物由来の抗体であっても一般的なこれらの方法に準じて行えばよい。

## 【0023】

また、免疫沈降に用いる本発明のタンパク質は、例えば、特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位（エピトープ）がタンパク質のN末端またはC末端に導入されていてもよい。このようにエピトープとの融合タンパク質とすれば、該エピトープに対する抗体を反応させることにより、免疫複合体を形成させることができる。

## 【0024】

用いるエピトープー抗体系としては市販されているものが多くあるので、それらを利用することも可能である（実験医学 13, 85-90 (1995)）。例えば、マルチクローニングサイトを介して所望のタンパク質をコードするDNAを組み込むことにより、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（Green fluorescent protein）などの比較的大きな融合タンパク質を発現できるベクターが市販されている。融合

タンパク質にすることによりもたらされる目的のタンパク質の性質の変化を最小限にするために、数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分だけを導入する方法も報告されている。その例としては、ポリヒスチジン (His-tag) ）、インフルエンザ凝集素HA、ヒトc-myc、FLAG、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSV-GP) 、T7遺伝子10タンパク質 (T7-tag) 、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 (HSV-tag) 、E-tag (モノクローナルファージ上のエピトープ) などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体が使用できる（実験医学 13, 85-90 (1995))。これら以外にも融合タンパク質を検出できるのであれば、どのようなエピトープー抗体系を用いてもよい。なお、融合タンパク質の場合には、抗体を用いなくとも、アフィニティークロマトグラフィーを用いて本発明のタンパク質に結合するタンパク質を単離しうる。例えば、GST融合タンパク質の場合には、グルタチオンーセファロース4Bカラムを用いればよい。

#### 【0025】

免疫沈降されたタンパク質の解析にはSDS-PAGEが一般的に用いられ、適当な濃度のゲルを用いることで、タンパク質の分子量により、結合したタンパク質を解析することができる。また、この際、一般的には結合していたタンパク質は、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色や銀染色のようなタンパク質の通常の染色法で検出することは困難であるので、細胞培養時に<sup>35</sup>S-メチオニンや<sup>35</sup>S -システインを含んだ培養液で培養することでタンパク質をラベルすると検出感度をあげることができる。分子量が明らかとなれば、直接SDS-ポリアクリルアミドゲルから該当するタンパク質を精製し、その配列を決定することもできる。上記免疫沈降法以外の方法としては、本発明のタンパク質を固定したアフィニティーカラムに本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞の培養上清もしくは細胞抽出物を通過させ、カラムに特異的に結合するタンパク質を精製することにより調製することも可能である。

#### 【0026】

また、本発明のタンパク質を用いてこれに結合するタンパク質をコードする遺伝子を直接スクリーニングすることも可能である。このスクリーニング法は、本発明のタンパク質に被検遺伝子の遺伝子産物を接触させ、本発明のタンパク質に

結合する遺伝子産物に対応する遺伝子を選択する工程を含む。被検遺伝子としては、特に制限はない。例えば、本発明のタンパク質に結合するタンパク質が発現していると考えられる所望の細胞から調製したcDNAライブラリーが好適に用いられる。具体的な方法の一例として、酵母の2ハイブリッド系を利用する方法が挙げられる(Fields, S. and Song, O. *Nature* 340, 245-247 (1989))。即ち、本発明のタンパク質をSRF結合領域、GAL4結合領域またはLexA結合領域に融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16、GAL4転写活性化領域、またはB42大腸菌ペプチドと融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローニングからライブラリー由来cDNAを単離する（酵母細胞内で本発明のタンパク質と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローニングが確認できる）。

#### 【0027】

この系に用いられるベクターおよび発現ライブラリーは購入することができる所以、これを利用してよい(Clontech社、MATCHMAKER Two-Hybrid System; Stratagene社、HybriZAP II Two-Hybrid System)。具体的な方法についてはこれらのマニュアルに従えばよい。この方法により本発明のタンパク質に結合するタンパク質をコードする遺伝子を直接得ることができる。実際にこの酵母の2ハイブリッド系を用いてAPCとhDLGの結合(A. Matsumine et al. *Science* 272, 1020-1023 (1996)); GRIPとAMPAレセプターの結合(H. Dong et al. *Nature* 386, 279-284 (1997)); Homerとグルタミン酸レセプターの結合(P. R. Brakeman et al. *Nature* 386, 284-288 (1997)); SRYとSIP-1の結合(F. Poulat et al. *J. Biol. Chem.* 272, 7167-7172 (1997))などが確認され、PDZドメインを有するタンパク質の標的タンパク質が同定されている。

#### 【0028】

また、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞（例えば、ヒトさい帯内皮細胞など）よりファージベクター(λgt11、ZAPなど)を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させ、フィルターに発現させたタンパク質を固定し、本発明のタンパク質をビオチ

ンラベルするか、またはGSTタンパク質との融合タンパク質として精製し、これを上記フィルターと反応させ、結合するタンパク質を発現しているブラークを、ストレプトアビシン、あるいは抗GST抗体により検出する「ウエストウエスタンプロットティング法」(Skolnik EY, Margolis B, Mohammadi M, Lowenstein E, Fischer R, Drepps A, Ullrich A, and Schlessinger J (1991) Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. Cell 65, 83-90)を用いてスクリーニングすることも可能である。なお、これにより単離された遺伝子を大腸菌などに導入して発現させることにより、該遺伝子がコードするタンパク質を調製することも可能である。

#### 【0029】

このような本発明のタンパク質を用いてこれに結合するタンパク質またはその遺伝子を単離し、解析することにより、このタンパク質—タンパク質相互作用を介したシグナル伝達経路の解明が可能となると考えられる。さらに、このようなシグナル伝達と疾患との関連が明らかになれば、本発明のタンパク質やこれと相互作用するタンパク質を標的とした医薬品の開発が可能となる。また、これらタンパク質をコードするDNAに対するアンチセンスDNAを用いた治療なども可能になるとを考えられる。なお、アンチセンスDNAは、種々の修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドが利用されているが、例えば、ホスホロチオネット(S-オリゴ)は安定性、水溶性において好適である。アンチセンスDNAの導入法としては、直接投与法、リポフェクション、HVJ法、HVJ-リポソーム法などが挙げられる。また、ベクターやリボザイムを用いたアンチセンスRNAによる治療も可能であり、前述の動物細胞での組み換えタンパク質の作製に用いたベクターに本発明のDNAを逆向きに導入し、直接投与法、リポフェクション、HVJ法、HVJ-リポソーム法などで導入し体内で発現させるなどして遺伝子治療を行うことが可能である。また、アデノ関連ウイルス、アデノウイルス、ヒト単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ファウルボックスウイルスなどのウイルスベクターを用いた遺伝子導入法によりアンチセンスRNAを体内で発現する方法も可能である。

#### 【0030】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

## 【0031】

## 【実施例1】 遺伝子のクローニング

## (1) ディファレンシャル・ディスプレイ

HUVEC（ヒトさい帯血管内皮細胞）を森永生科学研究所より正常ヒト血管内皮細胞培養キット（Catalog #680051）を用いて培養し、サブコンフルエントの状態になったところで10ng/mlのTNFアルファ（Recombinant Human Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ 、Catalog #300-01A、PEPROTECH Inc.）を添加し、24時間培養し、無添加の細胞と発現している遺伝子を比較した。トリプシン-EDTAで細胞を剥離し、1000rpm、5分の遠心操作により細胞を沈殿させ、一度PBSにて洗浄したのち、キヤゲン社（QIAGEN）の「RNAeasy Total RNAキット」（フナコシ DG-0741-04）により全RNAを回収した。回収した全RNAのうち0.2 $\mu$ gを用いて、H-T11GアンカープライマーによりcDNAを合成した。条件は「RNAimageキット」（GenHunter Corporation社）に添付のマニュアルに従い、アービタリープライマー、H-AP1からH-AP8の8種類のプライマーについて94℃30秒、40℃2分、72℃30秒のサイクルを40回おこなうPCR（polymerase chain reaction）反応により、「TAKARA Taqポリメラーゼ」を用いてランダムに遺伝子を増幅した。反応液にはアルファ<sup>33</sup>P dATPが含まれており、シーケンスゲル泳動にて分離した。TNFアルファの刺激によりバンドが濃くなっているもの、つまり、mRNAの発現が無刺激に比べて上昇しているものを再度同じ条件にて増幅し、増幅された断片を「Qiaquick spin PCR精製キット」を使用して、反応液中に存在するプライマー-DNAを除去し、増幅に用いた同じプライマーを用いて「Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction kit」（パーキンエルマー社、Catalog #402122）により解析することにより、配列番号：3に示す「DDEST32」の塩基配列の情報が得られた。

## 【0032】

## (2) cDNAライブラリーの構築

「ZAP-cDNA合成キット」（STRATAGENE社製）を用いてcDNAライブラリーを構築

した。5  $\mu$  lの10x 第1鎖バッファー (first-strand buffer)、3  $\mu$  lの第1鎖メチルヌクレオチドミックス (first-strand methyl nucleotide mix)、2  $\mu$  lのリンカープライマー (linker-primer) (1.4  $\mu$  g/ $\mu$  l)、1  $\mu$  lのRNaseプロックリボヌクレアーゼ阻害剤 (RNase Block Ribonuclease Inhibitor) (40  $\mu$  / $\mu$  l)、10  $\mu$  lのTNFアルファ刺激HUVECポリA<sup>+</sup>mRNA (0.5  $\mu$  g/ $\mu$  l)、24  $\mu$  lのDEPC(ジエチルピロカルボネート) 処理済みの水を穏やかに混合し、室温で10分放置した。5  $\mu$  lの「SuperScript II逆転写酵素」(200  $\mu$  / $\mu$  l) (GIBCO-BRL) を混合し、37°Cにて40分間保温し、さらに45°Cにて70分保温した。反応液を氷上に置き、45  $\mu$  lの第1鎖反応液に20  $\mu$  lの10x 第2鎖バッファー (second-strand buffer)、6  $\mu$  lの第2鎖ヌクレオチド混合物 (second-strand nucleotide mixture)、115.9  $\mu$  lの滅菌蒸留水、RNase H (1.5  $\mu$  / $\mu$  l)、11.1  $\mu$  lのDNAポリメラーゼI (9  $\mu$  / $\mu$  l) をボルテックスして混合し、16°Cで150分間保温した。反応後、23  $\mu$  lのブランティングdNTPミックス (blunting dNTP mix)、2  $\mu$  lのクローン化Pfu DNAポリメラーゼ (cloned Pfu DNA polymerase) (2.5  $\mu$  / $\mu$  l) を加えて、72°Cにて30分間保温した。200  $\mu$  lのフェノール／クロロホルム、クロロホルムで順次抽出し、さらに20  $\mu$  lの3M酢酸ナトリウム、400  $\mu$  lの100%エタノールにて沈殿させた。-20°Cで一晩置いた後、15,000回転60分間4°Cでの遠心操作により得られた沈殿は、500  $\mu$  lの70%エタノールで洗浄し乾燥させた。0.4  $\mu$  g/ $\mu$  lの濃度の EcoR Iアダプター9  $\mu$  lで沈殿を溶かし、4°Cで45分置いた。1  $\mu$  lの10x リガーゼバッファー (Ligase buffer)、1  $\mu$  lの10mM ATP、1  $\mu$  lのT4 DNAリガーゼ (4  $\mu$  / $\mu$  l) を添加し、8°Cにて一晩連結反応を行った。70°Cにて30分保温し、酵素を失活させ、遠心操作で反応液をチューブの底に集めた後、5分間室温に放置した。1  $\mu$  lの10x リガーゼバッファー (Ligase buffer)、2  $\mu$  lのATP、6  $\mu$  lの滅菌水、1  $\mu$  lのT4ポリヌクレオチドキナーゼ (10  $\mu$  / $\mu$  l) を加え、37°Cで30分保温した後70°Cで30分保温して酵素を失活させた。28  $\mu$  lのXho Iバッファー補助 (buffer supplement)、3  $\mu$  lのXho I (40  $\mu$  / $\mu$  l) を加え、37°C90分間反応させた。室温に戻した後、5  $\mu$  lの10x STEバッファーを添加し、「Sephacryl S-500」カラムにかけて、60  $\mu$  lの1xSTE bufferで2回溶出し、120  $\mu$  lのエタノールを加えて、-20°Cで一晩置いた。15,000回転で4°Cにて60分遠心し、沈殿を得た。200  $\mu$  lの80%エタノールで洗い、さらに沈

殿を乾燥させた。6  $\mu$ lの滅菌水で溶解してそのうちの 2.5  $\mu$ lを用いてベクターへの連結反応を行った。2.5  $\mu$ lのcDNAに対して、1  $\mu$ lのUni-ZAP XRベクター(1  $\mu$ g)、0.5  $\mu$ lの10x リガーゼバッファー (Ligase buffer)、0.5  $\mu$ lの10mM ATP、0.5  $\mu$ lのT4 DNAリガーゼ(4  $\mu$ /  $\mu$ l) を加えて12°Cにて一晩反応させた。「Gigapack III Gold Packaging Extract」に1  $\mu$ lのライゲーション混合液 (ligation mixture) を添加し、良く混合し、室温にて2時間保温した。500  $\mu$ lのSMバッファー (5.8g NaCl、2.0g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、50ml 1M Tris-HCl (pH7.5)、5ml 2% (w/v)ゼラチンを脱イオン水で1Lとしたもの) を加え、さらに20  $\mu$ lのクロロホルムを加えた後、穏やかに混合した。遠心し、その上清を別のチューブに移して4°Cに保存した。0.1  $\mu$ l、1  $\mu$ lのパッケージ化反応液 (packaged reaction) を用いてファージのタイターを測定した。0.1  $\mu$ lから約300のplaquesが得られたことから1  $\mu$ lあたり3000PFU (plaque forming unit) と考えられた。宿主大腸菌には XL1 Blue MRF' を用いた。20ml LB/10mM MgSO<sub>4</sub>/0.2%マルトースで37°C 6時間培養し、OD<sub>600</sub>が1.0になる前に氷上に5分置き、500xgで10分遠心した。沈殿した菌に対して10mlの10mM MgSO<sub>4</sub>を加えて懸濁し、OD<sub>600</sub>が0.5となるように10mM MgSO<sub>4</sub>で希釈した。17  $\mu$ lのパッケージ化反応液 (packaged reaction) を600  $\mu$ lの新鮮に調製されたXL-1 Blue MRF' に加え、37°Cで15分保温した。45°Cにあらかじめ保温しておいた6.5ml NZYトップアガー (NZY Top Agar) (0.7% (w/v)アガロースをNZY培地に加えオートクレーブしたもの) を加えてNZY寒天プレート (5gのNaCl、2.0gのMgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、5gの酵母抽出物、10gのNZアミン、15gの寒天を脱イオン水で1Lとしたもの、pHはNaOHで7.5に調整し、オートクレーブ後、滅菌済みのシャーレにまいたもの) にまいた。37°Cで6時間培養し、「Hybond N+ filter」 (アマシャム社製、RPN203B) をプレート上においてplaquesを移し、1.5M NaCl/0.5M NaOHで7分間変性させた後、1.5M NaCl/0.5M Tris-HCl (pH7.2)/1mM EDTAで5分間処理することにより中和し、最後に2X SSCでリノスした。乾燥させたのち、「StrataLinker」 (Stratagen社製) を用いて120mJのUVでフィルターにplaquesを固定した。

### (3) cDNAライブラリーのスクリーニング

「DDEST32」のDNA断片は2%アガロースゲルにより分離し、キアゲン社の「QI

AEX II Gel Extractionキット」(フナコシ DG-0200-21)によりアガロース切片から回収した。これをプローブとして、ランダムラベルによりラベルした。アマシャム社の「Megaprimeキット」(RPN1607)を用い、25ngのプローブDNAに対して5 $\mu$ lのプライマー溶液(Primer Solution)を加えて、95℃にて5分保温した。室温にて放置し、さらに10 $\mu$ lのラベリングバッファー(Labeling buffer)、18 $\mu$ lの水、アルファ<sup>32</sup>P dCTP、2 $\mu$ lのクレノウ・フラグメントを混合し、37℃で30分間保温した。2 $\mu$ lの0.5M EDTAを添加して反応を停止させ、「Pharmacia Prob eQuant G-50カラム」にて遊離のアルファ<sup>32</sup>P dCTPを除去した。60℃にて「Rapid hybri buffer」(アマシャム社製、RPN1636)でプレハイブリダイゼーションした後、ラベルされたプローブを95℃で熱変性させ、氷上で急冷し、ハイブリバッファーに添加し、60℃で2時間震とうしながらハイブリダイゼーションさせた。プローブは2x10<sup>6</sup>cpm/mlの濃度で用いた。2XSSC/0.05%SDSで10分3回室温でフィルターを洗浄し、さらに0.1XSSC/0.1%SDSで60℃で20分の洗浄を2回行った。ポジティブだったプランクから拾ったファージはSMバッファーで希釈し、10cmシャーレに約100プランクが形成されるように希釈してまいた。こうして2次スクリーニングを行い、さらに3次スクリーニングまで行った。その結果、陽性クローンとしてクローン「#32-8-1」を得た。Uni-ZAPベクターにクローニングされている遺伝子は、インビボ切除法により通常のプラスミドDNAとして回収した。

### 【0033】

#### [実施例2] 「32-8-1遺伝子」の配列の決定

##### (1) RACEのためのcDNAライブラリーの作製

クロンテック社(CLONTECH社製)の「Marathon cDNA amplification kit」(T0 YOBO CLK1802-1)を用いてRACEのためのcDNAを合成した。TNFアルファ刺激したHUVEC細胞から得られた全RNA 1 $\mu$ gを用いて実験を行った。10 $\mu$ MのオリゴdTプライマーを1 $\mu$ l加え、全量5 $\mu$ lとし、70℃にて2分保温し、2分間氷上に置いた。これに2 $\mu$ lの5X 第1鎖バッファー(First-strand buffer)、1 $\mu$ lの10mM dNTPミックス、1 $\mu$ lの100unit/ $\mu$ lのMMLV逆転写酵素を加え10 $\mu$ lとして、42℃で1時間保温し、第1鎖cDNAを合成した。これにさらに5x第2鎖バッファー(Second-strand buffer) 16 $\mu$ l、10mM dNTPミックス1.6 $\mu$ l、20x第2鎖酵素液(Second-strand

enzume cocktail) 4  $\mu$ lを加え、水を加えて、全量80  $\mu$ lとして16°Cで90分間保温した。5units/ $\mu$ lのT4 DNAポリメラーゼ2  $\mu$ lを添加した後、16°C45分の反応を行った。4  $\mu$ lの20X EDTA/グリコーゲンを添加した後、等量のフェノール／クロロフォルム、イソアミルアルコール／クロロフォルムで除タンパク質を行った。

#### 【0034】

35  $\mu$ lの4M酢酸アンモニウム、263  $\mu$ lの95%エタノールでエタノール沈殿をし、80%エタノールで洗浄し、10分間自然乾燥させた。脱イオン水10  $\mu$ lに溶解し、7.5  $\mu$ lを使ってアダプターの連結反応を行った。3  $\mu$ lの10  $\mu$ M「Marathon cDNA adaptor」、3  $\mu$ lの5X DNAライゲーション・バッファー（ligation buffer）、1.5  $\mu$ lの(1units/ $\mu$ l) T4 DNAリガーゼを加えて、16°Cにて1晩反応させた。70°C5分の保温により、酵素を失活せしめ、キットに添付のトリシン（Tricine）-EDTAバッファー135  $\mu$ lを加えて全量150  $\mu$ lとした。

#### 【0035】

##### (2) RACEによるcDNAクローンのクローニングと塩基配列の決定

「32-8-1遺伝子」は遺伝子内にある制限酵素認識部位、Pst I、Xba I、BamH I、EcoRIを使ってサブクローニングを行い、「Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction kit」（パーキンエルマー社製、Catalog #402122）を用いたサイクルシークエンス法にて塩基配列を決定した。

#### 【0036】

以下に、用いたプライマーの配列を示す。「C」は相補鎖DNAに対するプライマーであることを示す。

#### 【0037】

【表1】

プライマー番号		DNA配列	
106	C	CTC CCC ATC CCT CGT CCA CC	(配列番号：10)
XE	C	CTC TGA CTC TGA CTG ACT GG	(配列番号：11)
EX		ATG AGT TTG GTT ACA GCT GG	(配列番号：12)

402		TCA GAG AGC GTT ATG GAA CC	(配列番号 : 13)
XER		AGT CTT GCT GGG AAC AAA GA	(配列番号 : 14)
801		ACT GTT ACT ACT TCT GAT GC	(配列番号 : 15)
1192-1161		TCT GAT GGT CCC ACA GTC TG	(配列番号 : 16)
1282	C	GTT GTT TCG CAG CCA GGG AT	(配列番号 : 17)
1524		CTG AGC ATC GTT GGG GGT TC	(配列番号 : 18)
1449	C	CCT CAT CTC TGT AGA GTG TC	(配列番号 : 19)
1683		TGT TAG CCC CCT CAC TAA GG	(配列番号 : 20)
1803		GCT ATG TGC TAG GAA ATA CG	(配列番号 : 21)
2116		TAG GGA GAA GGA TCA GAG CG	(配列番号 : 22)
607-93		ACA GAT TTC TGA CTC ACT GG	(配列番号 : 23)
128		TGG AAA TAG GCA TTC TTC AG	(配列番号 : 24)
607-462		ATA CAA AGA CGG TCT AAT CC	(配列番号 : 25)
2920	C	CCG CTT TCC CAT CTT TAG AAA C	(配列番号 : 26)
3121		TAT CTC GTG TGG AAG ATG TG	(配列番号 : 27)
2266-107	C	ACA TAA ATG TTG CTA TCA CC	(配列番号 : 28)
3361		TGC CAC TTA GTA GCC GAG TG	(配列番号 : 29)
3615		GCA TTG CAT TAC AGT TGA GC	(配列番号 : 30)
1301	C	TCC TCC TTT GAC AAT GTC TG	(配列番号 : 31)
BXR	C	CAT TTC GAC TGT TCT TAA TC	(配列番号 : 32)
XB	C	TCA GTG GAT GTG CCA CAG AT	(配列番号 : 33)
4221	C	CAG TAG GTT AAC TGC TTC GG	(配列番号 : 34)
BX		AGT TCC AGT CTT TCT TTC GG	(配列番号 : 35)
4335		TTT CTT TCA CTG GGC TGA AGT C	(配列番号 : 36)
XBR		CCT CTG AAG ACG GAC GTC TG	(配列番号 : 37)

さらに、解析の終了した領域から20残基からなるオリゴヌクレオチドをプライマー（表1）として合成し、配列の解析結果を確認した。5146bpの塩基配列が決定された。EcoR Iの認識部位の最初のGの塩基を番号1とした際の468番目の塩基

からPDZドメインは始まり、約80アミノ酸の繰り返し構造が3つ存在したが、その直後に終止コドンが存在していた。遺伝子の3'領域の配列にも先の終止コドンから約2kb離れたところに3個のPDZドメインを見い出した。そこで後半に存在する3個のPDZドメインの位置から5' RACE (Rapid amplification of cDNA End) を行った。前述の5μlのcDNAを使ってキットのマニュアルに従い、5' RACEを行った。反応液は、5μlのcDNA、5μlの10x 「Advantage<sup>TM</sup> KlenTaq buffer」（キット添付のものを使用）、4μlの2.5mM dNTP、1μlの10μM AP1プライマー (CCATCCTAATA CGACTCACTATAAGGGC(配列番号：38))、1μlの10μM 32-8-1 5' RACEプライマー#22 (TTGGGGTGGGGAGAGGAGGTAGATTGC(配列番号：39))、1μlの「Advantage<sup>TM</sup> KlenTaq polymerase mix」 (TOYOB0 CLK8417-1)、33μlの脱イオン水を混合し、50μlとした。「PerkinElmer Thermal Cycler 2400」を使ってPCR反応を行った。94℃1分、94℃5秒-72℃2分を5回、94℃5秒-70℃2分を5回、94℃5秒-68℃2分を25回の反応でははっきりしたバンドを検出することはできなかった。同じ条件でnested PCRを行い、約1.8kbのバンドを得た。但し、プライマーはAP2プライマー (ACTC ACTATAGGGCTCGAGCGGC(配列番号：40))、32-8-1 5' RACEプライマー#1034 (GCACATCACCAAGTGGGCTGCCTACTC(配列番号：41)) を用い、最初のPCR産物を50倍に希釈したもの用いた。また、94℃5秒-68℃2分を25回ではなく15回でおこなった。その結果、2kbのギャップのないcDNAクローンを得ることが出来た。

## 【0038】

以下に、用いたプライマーの配列を示す。「C」は相補鎖DNAに対するプライマーであることを示す。

## 【0039】

【表2】

プライマー番号	DNA配列
EX	ATG AGT TTG GTT ACA GCT GG (配列番号：42)
456 C	AAT CTA ATG CAG CTC GCC TG (配列番号：43)
XER	AGT CTT GCT GGG AAC AAA GA (配列番号：44)

678	C	TCA CTT TAG AAG GGG CAC AT (配列番号 : 45)
801		ACT GTT ACT ACT TCT GAT GC (配列番号 : 46)
1192-1161		TCT GAT GGT CCC ACA GTC TG (配列番号 : 47)
1282	C	GTT GTT TCG CAG CCA GGG AT (配列番号 : 48)
1524		CTG AGC ATC GTT GGG GGT TC (配列番号 : 49)
1449	C	CCT CAT CTC TGT AGA GTG TC (配列番号 : 50)
2116		TAG GGA GAA GGA TCA GAG CG (配列番号 : 51)
1301	C	TCC TCC TTT GAC AAT GTC TG (配列番号 : 52)
839		TTT CAT CAT CTA CAG CCA GT (配列番号 : 53)
1389		TGA CAC CCT CAC TAT TGA GC (配列番号 : 54)

[実施例3] マウス90RF結合タンパク質 (mouse 90RF binding protein) との  
ホモロジー検索

BLASTN検索およびBLASTP検索の結果、2703bpからなる「Mus musculus 90RF binding protein 1 (9BP-1) mRNA, partial cds.」(LOCUS: MMAF000168, ACCESSION: AF000168) が相同性のある遺伝子として検出された。なお、この遺伝子の登録記載日は18-MAY-1997であった。タンパク質間のホモロジー検索の結果をなべたものを図1にしめす。

【0040】

[実施例4] ノーザンブロッティングによる発現の組織特異性の解析

「Clontech Human Tissue Northern (MTN) Blot」(Catalog #7760-1)、「Human Tissue Northern (MTN) Blot IV」(Catalog #7766-1) を用いて遺伝子発現の組織特異性を解析した。ノーザンプロットは常法にて従い、BamH I-Xba I 断片をプローブとして使い、アマシャム社の「Megaprime DNA labelling kit」(catalog RPN1607)を用いて25ngのDNA 断片をアルファ<sup>32</sup>P dCTPでラベルした。MTN BlotとMTN Blot IVは「ExpressHyb Hybridization Solution」(Clontech Catalog 8015-2) 5mlにて 68°C 30分間プレハイブリダイゼーションを行い、 $1 \times 10^7$  cpm のラベルされたプローブを同じく「ExpressHyb Hybridization Solution」5ml ( $2 \times 10^6$  cpm / ml)にて 68°C 2時間ハイブリダイズさせた。2x SSC (0.3M NaCl, 0.

0.03Mクエン酸ナトリウム(pH7.0))/0.05%SDSを用いて室温で10分3回フィルターを洗い、さらに0.1X SSC/0.1%SDSにて50℃で15分2回洗浄した後、「FUJI Imaging plate」にて1晩感光させ、「FUJI BAS2000」にて解析した。図2にあるように組織としては、心臓、胎盤、肝臓、骨格筋、すい臓においてmRNAの発現が高かった。約8kbの転写物を同定したが、肝臓においては5.5kbの短い転写物の発現が確認された。また、どの組織にも発現は見られたが腎臓および肺においては遺伝子の発現は低かった。

#### 【0041】

#### 【発明の効果】

本発明により、PDZドメインを有する新規なタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子が提供された。本発明のタンパク質および遺伝子を利用することにより、本発明のタンパク質に結合する抗体や、PDZドメインに結合するタンパク質およびその遺伝子を単離することができ、PDZドメインを介した細胞内でのシグナル伝達経路の解明が可能となった。さらに、細胞増殖、細胞周期、癌化、アポトーシス、細胞接着等とこのシグナル伝達との関係が解明されれば、本発明のタンパク質やこれと相互作用するタンパク質を標的とした疾患の治療へつながると考えられるため、これらタンパク質やその遺伝子は治療薬の開発や診断に有用である。

【0042】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：763

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列の特徴

配列

Met Gly Ser Asn His Thr Gln Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ser Gln Asp

1 5 10 15

Val Asp Lys Glu Asp Glu Phe Gly Tyr Ser Trp Lys Asn Ile Arg Glu

20 25 30

Arg Tyr Gly Thr Leu Thr Gly Glu Leu His Met Ile Glu Leu Glu Lys

35 40 45

Gly His Ser Gly Leu Gly Leu Ser Leu Ala Gly Asn Lys Asp Arg Ser

50 55 60

Arg Met Ser Val Phe Ile Val Gly Ile Asp Pro Asn Gly Ala Ala Gly

65 70 75 80

Lys Asp Gly Arg Leu Gln Ile Ala Asp Glu Leu Leu Glu Ile Asn Gly

85 90 95

Gln Ile Leu Tyr Gly Arg Ser His Gln Asn Ala Ser Ser Ile Ile Lys

100 105 110

Cys Ala Pro Ser Lys Val Lys Ile Ile Phe Ile Arg Asn Lys Asp Ala

115 120 125

Val Asn Gln Met Ala Val Cys Pro Gly Asn Ala Val Glu Pro Leu Pro

130 135 140

Ser Asn Ser Glu Asn Leu Gln Asn Lys Glu Pro Glu Pro Thr Val Thr

145 150 155 160

Thr Ser Asp Ala Ala Val Asp Leu Ser Ser Phe Lys Asn Val Gln His  
 165 170 175  
 Leu Glu Leu Pro Lys Asp Gln Gly Gly Leu Gly Ile Ala Ile Ser Glu  
 180 185 190  
 Glu Asp Thr Leu Ser Gly Val Ile Ile Lys Ser Leu Thr Glu His Gly  
 195 200 205  
 Val Ala Ala Thr Asp Gly Arg Leu Lys Val Gly Asp Gln Ile Leu Ala  
 210 215 220  
 Val Asp Asp Glu Ile Val Val Gly Tyr Pro Ile Glu Lys Phe Ile Ser  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Lys Thr Ala Lys Met Thr Val Lys Leu Thr Ile His Ala Glu  
 245 250 255  
 Asn Pro Asp Ser Gln Ala Val Pro Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ser Gly  
 260 265 270  
 Glu Lys Lys Asn Ser Ser Gln Ser Leu Met Val Pro Gln Ser Gly Ser  
 275 280 285  
 Pro Glu Pro Glu Ser Ile Arg Asn Thr Ser Arg Ser Ser Thr Pro Ala  
 290 295 300  
 Ile Phe Ala Ser Asp Pro Ala Thr Cys Pro Ile Ile Pro Gly Cys Glu  
 305 310 315 320  
 Thr Thr Ile Glu Ile Ser Lys Gly Arg Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile  
 325 330 335  
 Val Gly Gly Ser Asp Thr Leu Leu Gly Ala Phe Ile Ile His Glu Val  
 340 345 350  
 Tyr Glu Glu Gly Ala Ala Cys Lys Asp Gly Arg Leu Trp Ala Gly Asp  
 355 360 365  
 Gln Ile Leu Glu Val Asn Gly Ile Asp Leu Arg Lys Ala Thr His Asp  
 370 375 380  
 Glu Ala Ile Asn Val Leu Arg Gln Thr Pro Gln Arg Val Arg Leu Thr

385	390	395	400
Leu Tyr Arg Asp Glu Ala Pro Tyr Lys Glu Glu Glu Val Cys Asp Thr			
405	410	415	
Leu Thr Ile Glu Leu Gln Lys Lys Pro Gly Lys Gly Leu Gly Leu Ser			
420	425	430	
Ile Val Gly Lys Arg Asn Asp Thr Gly Val Phe Val Ser Asp Ile Val			
435	440	445	
Lys Gly Gly Ile Ala Asp Pro Asp Gly Arg Leu Ile Gln Gly Asp Gln			
450	455	460	
Ile Leu Leu Val Asn Gly Glu Asp Val Arg Asn Ala Ser Gln Glu Ala			
465	470	475	480
Val Ala Ala Leu Leu Lys Cys Ser Leu Gly Thr Val Thr Leu Glu Val			
485	490	495	
Gly Arg Ile Lys Ala Gly Pro Phe His Ser Glu Arg Arg Pro Ser Gln			
500	505	510	
Thr Ser Gln Val Ser Glu Gly Ser Leu Ser Ser Phe Thr Phe Pro Leu			
515	520	525	
Ser Gly Ser Ser Thr Ser Glu Ser Leu Glu Ser Ser Ser Lys Lys Asn			
530	535	540	
Ala Leu Ala Ser Glu Ile Gln Gly Leu Arg Thr Val Glu Met Lys Lys			
545	550	555	560
Gly Pro Thr Asp Ser Leu Gly Ile Ser Ile Ala Gly Gly Val Gly Ser			
565	570	575	
Pro Leu Gly Asp Val Pro Ile Phe Ile Ala Met Met His Pro Thr Gly			
580	585	590	
Val Ala Ala Gln Thr Gln Lys Leu Arg Val Gly Asp Arg Ile Val Thr			
595	600	605	
Ile Cys Gly Thr Ser Thr Glu Gly Met Thr His Thr Gln Ala Val Asn			
610	615	620	

Leu Leu Lys Asn Ala Ser Gly Ser Ile Glu Met Gln Val Val Ala Gly  
 625 630 635 640  
 Gly Asp Val Ser Val Val Thr Gly His His Gln Glu Pro Ala Ser Ser  
 645 650 655  
 Ser Leu Ser Phe Thr Gly Leu Thr Ser Thr Ser Ile Phe Gln Asp Asp  
 660 665 670  
 Leu Gly Pro Pro Gln Cys Lys Ser Ile Thr Leu Glu Arg Gly Pro Asp  
 675 680 685  
 Gly Leu Gly Phe Ser Ile Val Gly Gly Tyr Gly Ser Pro His Gly Asp  
 690 695 700  
 Leu Pro Ile Tyr Val Lys Thr Val Phe Ala Lys Gly Ala Ala Ser Glu  
 705 710 715 720  
 Asp Gly Arg Leu Lys Arg Gly Asp Gln Ile Ile Ala Val Asn Gly Gln  
 725 730 735  
 Ser Leu Glu Gly Val Thr His Glu Glu Ala Val Ala Ile Leu Lys Arg  
 740 745 750  
 Thr Lys Gly Thr Val Thr Leu Met Val Leu Ser  
 755 760

配列番号：2

配列の型：核酸

配列の長さ：2819

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：43..2331

特徴を決定した方法：E

## 配列

ACCACCGCCT CCGCGGCACC CCCTCCTTCA GCCTTGCCG AA ATG GGT AGT AAT	54	
Met Gly Ser Asn		
1		
CAC ACA CAG TCA TCT GCA AGC AAA ATC TCA CAA GAT GTG GAC AAA GAG	102	
His Thr Gln Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ser Gln Asp Val Asp Lys Glu		
5	10	15
GAT GAG TTT GGT TAC AGC TGG AAA AAT ATC AGA GAG CGT TAT GGA ACC	150	
Asp Glu Phe Gly Tyr Ser Trp Lys Asn Ile Arg Glu Arg Tyr Gly Thr		
25	30	35
CTA ACA GGC GAG CTG CAT ATG ATT GAA CTG GAG AAA GGT CAT AGT GGT	198	
Leu Thr Gly Glu Leu His Met Ile Glu Leu Glu Lys Gly His Ser Gly		
40	45	50
TTG GGC CTA AGT CTT GCT GGG AAC AAA GAC CGA TCC AGG ATG AGT GTC	246	
Leu Gly Leu Ser Leu Ala Gly Asn Lys Asp Arg Ser Arg Met Ser Val		
55	60	65
TTC ATA GTG GGG ATT GAT CCA AAT GGA GCT GCA GGA AAA GAT GGT CGA	294	
Phe Ile Val Gly Ile Asp Pro Asn Gly Ala Ala Gly Lys Asp Gly Arg		
70	75	80
TTG CAA ATT GCA GAT GAG CTT CTA GAG ATC AAT GGT CAG ATT TTA TAT	342	
Leu Gln Ile Ala Asp Glu Leu Leu Glu Ile Asn Gly Gln Ile Leu Tyr		
85	90	95
GGA AGA AGT CAT CAG AAT GCC TCA TCA ATC ATT AAA TGT GCC CCT TCT	390	
Gly Arg Ser His Gln Asn Ala Ser Ser Ile Ile Lys Cys Ala Pro Ser		
105	110	115
AAA GTG AAA ATA ATT TTT ATC AGA AAT AAA GAT GCA GTG AAT CAG ATG	438	
Lys Val Lys Ile Ile Phe Ile Arg Asn Lys Asp Ala Val Asn Gln Met		
120	125	130
GCC GTA TGT CCT GGA AAT GCA GTA GAA CCT TTG CCT TCT AAC TCA GAA	486	

Ala Val Cys Pro Gly Asn Ala Val Glu Pro Leu Pro Ser Asn Ser Glu			
135	140	145	
AAT CTT CAA AAT AAG GAG CCA GAG CCA ACT GTT ACT ACT TCT GAT GCA			534
Asn Leu Gln Asn Lys Glu Pro Glu Pro Thr Val Thr Thr Ser Asp Ala			
150	155	160	
GCT GTG GAC CTC AGT TCA TTT AAA AAT GTG CAA CAT CTG GAG CTT CCC			582
Ala Val Asp Leu Ser Ser Phe Lys Asn Val Gln His Leu Glu Leu Pro			
165	170	175	180
AAG GAT CAG GGG GGT TTG GGT ATT GCT ATC AGC GAA GAA GAT ACA CTC			630
Lys Asp Gln Gly Gly Leu Gly Ile Ala Ile Ser Glu Glu Asp Thr Leu			
185	190	195	
AGT GGA GTC ATC ATA AAG AGC TTA ACA GAG CAT GGG GTA GCA GCC ACG			678
Ser Gly Val Ile Ile Lys Ser Leu Thr Glu His Gly Val Ala Ala Thr			
200	205	210	
GAT GGA CGA CTC AAA GTC GGA GAT CAG ATA CTG GCT GTA GAT GAT GAA			726
Asp Gly Arg Leu Lys Val Gly Asp Gln Ile Leu Ala Val Asp Asp Glu			
215	220	225	
ATT GTT GTT GGT TAC CCT ATT GAA AAG TTT ATT AGC CTT CTG AAG ACA			774
Ile Val Val Gly Tyr Pro Ile Glu Lys Phe Ile Ser Leu Leu Lys Thr			
230	235	240	
GCA AAG ATG ACA GTA AAA CTT ACC ATC CAT GCT GAG AAT CCA GAT TCC			822
Ala Lys Met Thr Val Lys Leu Thr Ile His Ala Glu Asn Pro Asp Ser			
245	250	255	260
CAG GCT GTT CCT TCA GCA GCT GGT GCA GCC AGT GGA GAA AAA AAG AAC			870
Gln Ala Val Pro Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ser Gly Glu Lys Lys Asn			
265	270	275	
AGC TCC CAG TCT CTG ATG GTC CCA CAG TCT GGC TCC CCA GAA CCG GAG			918
Ser Ser Gln Ser Leu Met Val Pro Gln Ser Gly Ser Pro Glu Pro Glu			
280	285	290	

TCC ATC CGA AAT ACA AGC AGA TCA TCA ACA CCA GCA ATT TTT GCT TCT	966
Ser Ile Arg Asn Thr Ser Arg Ser Ser Thr Pro Ala Ile Phe Ala Ser	
295 300 305	
GAT CCT GCA ACC TGC CCC ATT ATC CCT GGC TGC GAA ACA ACC ATC GAG	1014
Asp Pro Ala Thr Cys Pro Ile Ile Pro Gly Cys Glu Thr Thr Ile Glu	
310 315 320	
ATT TCC AAA GGG CGA ACA GGG CTG GGC CTG AGC ATC GTT GGG GGT TCA	1062
Ile Ser Lys Gly Arg Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile Val Gly Gly Ser	
325 330 335 340	
GAC ACG CTG CTG GGT GCC TTT ATT ATC CAT GAA GTT TAT GAA GAA GGA	1110
Asp Thr Leu Leu Gly Ala Phe Ile Ile His Glu Val Tyr Glu Glu Gly	
345 350 355	
GCA GCA TGT AAA GAT GGA AGA CTC TGG GCT GGA GAT CAG ATC TTA GAG	1158
Ala Ala Cys Lys Asp Gly Arg Leu Trp Ala Gly Asp Gln Ile Leu Glu	
360 365 370	
GTG AAT GGA ATT GAC TTG AGG AAG GCC ACA CAT GAT GAA GCA ATC AAT	1206
Val Asn Gly Ile Asp Leu Arg Lys Ala Thr His Asp Glu Ala Ile Asn	
375 380 385	
GTC CTG AGA CAG ACG CCA CAG AGA GTG CGC CTG ACA CTC TAC AGA GAT	1254
Val Leu Arg Gln Thr Pro Gln Arg Val Arg Leu Thr Leu Tyr Arg Asp	
390 395 400	
GAG GCC CCA TAC AAA GAG GAG GAA GTG TGT GAC ACC CTC ACT ATT GAG	1302
Glu Ala Pro Tyr Lys Glu Glu Glu Val Cys Asp Thr Leu Thr Ile Glu	
405 410 415 420	
CTG CAG AAG AAG CCG GGA AAA GGC CTA GGA TTA AGT ATT GTT GGT AAA	1350
Leu Gln Lys Lys Pro Gly Lys Gly Leu Gly Leu Ser Ile Val Gly Lys	
425 430 435	
AGA AAC GAT ACT GGA GTA TTT GTG TCA GAC ATT GTC AAA GGA GGA ATT	1398
Arg Asn Asp Thr Gly Val Phe Val Ser Asp Ile Val Lys Gly Gly Ile	

440	445	450	
GCA GAT CCC GAT GGA AGA CTG ATC CAG GGA GAC CAG ATA TTA TTG GTG			1446
Ala Asp Pro Asp Gly Arg Leu Ile Gln Gly Asp Gln Ile Leu Leu Val			
455	460	465	
AAT GGG GAA GAC GTT CGT AAT GCC TCC CAA GAA GCG GTT GCC GCT TTG			1494
Asn Gly Glu Asp Val Arg Asn Ala Ser Gln Glu Ala Val Ala Ala Leu			
470	475	480	
CTA AAG TGT TCC CTA GGC ACA GTA ACC TTG GAA GTT GGA AGA ATC AAA			1542
Leu Lys Cys Ser Leu Gly Thr Val Thr Leu Glu Val Gly Arg Ile Lys			
485	490	495	500
GCT GGT CCA TTC CAT TCA GAG AGG AGG CCA TCT CAA ACC AGC CAG GTG			1590
Ala Gly Pro Phe His Ser Glu Arg Arg Pro Ser Gln Thr Ser Gln Val			
505	510	515	
AGT GAA GGC AGC CTG TCT TCT TTC ACT TTT CCA CTC TCT GGA TCC AGT			1638
Ser Glu Gly Ser Leu Ser Ser Phe Thr Phe Pro Leu Ser Gly Ser Ser			
520	525	530	
ACA TCT GAG TCA CTG GAA AGT AGC TCA AAG AAG AAT GCA TTG GCA TCT			1686
Thr Ser Glu Ser Leu Glu Ser Ser Lys Lys Asn Ala Leu Ala Ser			
535	540	545	
GAA ATA CAG GGA TTA AGA ACA GTC GAA ATG AAA AAG GGC CCT ACT GAC			1734
Glu Ile Gln Gly Leu Arg Thr Val Glu Met Lys Lys Gly Pro Thr Asp			
550	555	560	
TCA CTG GGA ATC AGC ATC GCT GGA GGA GTA GGC AGC CCA CTT GGT GAT			1782
Ser Leu Gly Ile Ser Ile Ala Gly Gly Val Gly Ser Pro Leu Gly Asp			
565	570	575	580
GTG CCT ATA TTT ATT GCA ATG ATG CAC CCA ACT GGA GTT GCA GCA CAG			1830
Val Pro Ile Phe Ile Ala Met Met His Pro Thr Gly Val Ala Ala Gln			
585	590	595	
ACC CAA AAA CTC AGA GTT GGG GAT AGG ATT GTC ACC ATC TGT GGC ACA			1878

Thr Gln Lys Leu Arg Val Gly Asp Arg Ile Val Thr Ile Cys Gly Thr			
600	605	610	
TCC ACT GAG GGC ATG ACT CAC ACC CAA GCA GTT AAC CTA CTG AAA AAT			1926
Ser Thr Glu Gly Met Thr His Thr Gln Ala Val Asn Leu Leu Lys Asn			
615	620	625	
GCA TCT GGC TCC ATT GAA ATG CAG GTG GTT GCT GGA GGA GAC GTG AGT			1974
Ala Ser Gly Ser Ile Glu Met Gln Val Val Ala Gly Gly Asp Val Ser			
630	635	640	
GTG GTC ACA GGT CAT CAT CAG GAG CCT GCA AGT TCC AGT CTT TCT TTC			2022
Val Val Thr Gly His His Gln Glu Pro Ala Ser Ser Ser Leu Ser Phe			
645	650	655	660
ACT GGG CTG ACG TCA ACC AGT ATA TTT CAG GAT GAT TTA GGA CCT CCT			2070
Thr Gly Leu Thr Ser Thr Ser Ile Phe Gln Asp Asp Leu Gly Pro Pro			
665	670	675	
CAA TGT AAG TCT ATT ACA CTA GAG CGA GGA CCA GAT GGC TTA GGC TTC			2118
Gln Cys Lys Ser Ile Thr Leu Glu Arg Gly Pro Asp Gly Leu Gly Phe			
680	685	690	
AGT ATA GTT GGA GGA TAT GGC AGC CCT CAT GGA GAC TTA CCC ATT TAT			2166
Ser Ile Val Gly Gly Tyr Gly Ser Pro His Gly Asp Leu Pro Ile Tyr			
695	700	705	
GTT AAA ACA GTG TTT GCA AAG GGA GCA GCC TCT GAA GAC GGA CGT CTG			2214
Val Lys Thr Val Phe Ala Lys Gly Ala Ala Ser Glu Asp Gly Arg Leu			
710	715	720	
AAA AGG GGC GAT CAG ATC ATT GCT GTC AAT GGG CAG AGT CTA GAA GGA			2262
Lys Arg Gly Asp Gln Ile Ile Ala Val Asn Gly Gln Ser Leu Glu Gly			
725	730	735	740
GTC ACC CAT GAA GAA GCT GTT GCC ATC CTT AAA CGG ACA AAA GGC ACT			2310
Val Thr His Glu Glu Ala Val Ala Ile Leu Lys Arg Thr Lys Gly Thr			
745	750	755	

GTC ACT TTG ATG GTT CTC TCT TGAATTGGCT GCCAGAACATT AACCAACCCA 2361'

Val Thr Leu Met Val Leu Ser

760

ACCCCTAGCT CACCTCCTAC TGTAAAGAGA ATGCACTGGT CCTGACAATT TTTATGCTGT	2421
GTTCAGCCGG GTCTTCAAAA CTGTAGGGGG GAAATAACAC TTAAGTTCT TTTTCTCATC	2481
TAGAAATGCT TTCCTTACTG ACAACCTAAC ATCATTTC TTTTCTTCTT GCATTTGTG	2541
AACTTAAAGA GAAGGAATAT TTGTGTAGGT GAATCTCGTT TTTATTTGTG GAGATATCTA	2601
ATGTTTGTA GTCACATGGG CAAGAATTAT TACATGCTAA GCTGGTTAGT ATAAAGAAAG	2661
ATAATTCTAA AGCTAACCAA AGAAAATGGC TTCAGTAAGT TAGGATGAAA AATGAAAATA	2721
TAAAATAAAG AAGAAAATCT CGGGGAGTTT AAAAAAAATG CCTCAATTG GCAATCTACC	2781
TCCTCTCCCC ACCCCAAACT AAAAAAAAAA AAAAAAAA	2819

配列番号：3

配列の型：核酸

配列の長さ：184

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

配列

GCTATTTGA AAATATATTT ATATCTACGA AAAGAATTGG GAAAACAAAT ATTAAATCAG	60
AGAATTATTC CTTAAAGATT TAAAATGTAT TTAGTTGTAC ATTTTATATG GGTCACCCC	120
AGCACATGAA GTATAATGGT CAGATTATT TNGTATTTAT TTACTATTAT AACCACTTT	180
TAGG	184

配列番号：4

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：80

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

## 配列

Met Ile Glu Leu Glu Lys Gly His Ser Gly Leu Gly Leu Ser Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Asn Lys Asp Arg Ser Arg Met Ser Val Phe Ile Val Gly Ile Asp  
 20 25 30  
 Pro Asn Gly Ala Ala Gly Lys Asp Gly Arg Leu Gln Ile Ala Asp Glu  
 35 40 45  
 Leu Leu Glu Ile Asn Gly Gln Ile Leu Tyr Gly Arg Ser His Gln Asn  
 50 55 60  
 Ala Ser Ser Ile Ile Lys Cys Ala Pro Ser Lys Val Lys Ile Ile Phe  
 65 70 75 80

配列番号：5

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：78

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

## 配列

His Leu Glu Leu Pro Lys Asp Gln Gly Gly Leu Gly Ile Ala Ile Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Asp Thr Leu Ser Gly Val Ile Ile Lys Ser Leu Thr Glu His  
 20 25 30  
 Gly Val Ala Ala Thr Asp Gly Arg Leu Lys Val Gly Asp Gln Ile Leu  
 35 40 45  
 Ala Val Asp Asp Glu Ile Val Val Gly Tyr Pro Ile Glu Lys Phe Ile  
 50 55 60  
 Ser Leu Leu Lys Thr Ala Lys Met Thr Val Lys Leu Thr Ile  
 65 70 75

配列番号 : 6

配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 80

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Thr	Ile	Glu	Ile	Ser	Lys	Gly	Arg	Thr	Gly	Leu	Gly	Leu	Ser	Ile	Val
1								10						15	
Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Leu	Gly	Ala	Phe	Ile	Ile	His	Glu	Val	Tyr
				20					25				30		
Glu	Glu	Gly	Ala	Ala	Cys	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Trp	Ala	Gly	Asp	Gln
			35			40						45			
Ile	Leu	Glu	Val	Asn	Gly	Ile	Asp	Leu	Arg	Lys	Ala	Thr	His	Asp	Glu
			50			55				60					
Ala	Ile	Asn	Val	Leu	Arg	Gln	Thr	Pro	Gln	Arg	Val	Arg	Leu	Thr	Leu
	65			70				75				80			

配列番号 : 7

配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 79

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Thr	Ile	Glu	Leu	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Gly	Leu	Ser	Ile
1								10						15	
Val	Gly	Lys	Arg	Asn	Asp	Thr	Gly	Val	Phe	Val	Ser	Asp	Ile	Val	Lys
	20							25				30			
Gly	Gly	Ile	Ala	Asp	Pro	Asp	Gly	Arg	Leu	Ile	Gln	Gly	Asp	Gln	Ile
		35					40					45			

Leu Leu Val Asn Gly Glu Asp Val Arg Asn Ala Ser Gln Glu Ala Val  
 50 55 60  
 Ala Ala Leu Leu Lys Cys Ser Leu Gly Thr Val Thr Leu Glu Val  
 65 70 75

配列番号：8

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：83

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Val Glu Met Lys Lys Gly Pro Thr Asp Ser Leu Gly Ile Ser Ile  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Gly Val Gly Ser Pro Leu Gly Asp Val Pro Ile Phe Ile Ala  
 20 25 30  
 Met Met His Pro Thr Gly Val Ala Ala Gln Thr Gln Lys Leu Arg Val  
 35 40 45  
 Gly Asp Arg Ile Val Thr Ile Cys Gly Thr Ser Thr Glu Gly Met Thr  
 50 55 60  
 His Thr Gln Ala Val Asn Leu Leu Lys Asn Ala Ser Gly Ser Ile Glu  
 65 70 75 80  
 Met Gln Val

配列番号：9

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：82

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Ile Thr Leu Glu Arg Gly Pro Asp Gly Leu Gly Phe Ser Ile Val  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Tyr Gly Ser Pro His Gly Asp Leu Pro Ile Tyr Val Lys Thr  
 20 25 30  
 Val Phe Ala Lys Gly Ala Ala Ser Glu Asp Gly Arg Leu Lys Arg Gly  
 35 40 45  
 Asp Gln Ile Ile Ala Val Asn Gly Gln Ser Leu Glu Gly Val Thr His  
 50 55 60  
 Glu Glu Ala Val Ala Ile Leu Lys Arg Thr Lys Gly Thr Val Thr Leu  
 65 70 75 80  
 Met Val

配列番号 : 10

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CTCCCCATCC CTCGTCCACC 20

配列番号 : 11

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CTCTGACTCT GACTGACTGG 20

配列番号 : 12

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGAGTTTGG TTACAGCTGG

20

配列番号：13

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCAGAGAGCG TTATGGAACC

20

配列番号：14

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGTCTTGCTG GGAACAAAGA

20

配列番号：15

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACTGTTACTA CTTCTGATGC

20

配列番号：16

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCTGATGGTC CCACAGTCTG

20

配列番号：17

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTTGTTCGC AGCCAGGGAT

20

配列番号：18

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGAGCATCG TTGGGGGTTC

20

配列番号：19

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCATCTCT GTAGAGTGTC

20

配列番号：20

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGTTAGCCCC CTCACTAAGG

20

配列番号 : 21

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCTATGTGCT AGGAAATACG

20

配列番号 : 22

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TAGGGAGAAG GATCAGAGCG

20

配列番号 : 23

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ACAGATTCT GACTCACTGG

20

配列番号 : 24

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TGGAAATAGG CATTCTTCAG 20  
配列番号 : 25  
配列の型 : 核酸  
配列の長さ : 20  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA  
配列  
ATACAAAGAC GGTCTAATCC 20  
配列番号 : 26  
配列の型 : 核酸  
配列の長さ : 21  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA  
配列  
CCGCTTCCC ATCTTAGAAA C 21  
配列番号 : 27  
配列の型 : 核酸  
配列の長さ : 20  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA  
配列  
TATCTCGTGT GGAAGATGTG 20  
配列番号 : 28  
配列の型 : 核酸  
配列の長さ : 20  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA  
配列  
ACATAAATGT TGCTATCACC 20

配列番号 : 29

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TGCCACTTAG TAGCCGAGTG

20

配列番号 : 30

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCATTGCATT ACAGTTGAGC

20

配列番号 : 31

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TCCTCCTTG ACAATGTCTG

20

配列番号 : 32

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CATTTCGACT GTTCTTAATC

20

配列番号 : 33

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TCAGTGGATG TGCCACAGAT

20

配列番号 : 34

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CAGTAGGTTA ACTGCTTCGG

20

配列番号 : 35

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AGTTCCAGTC TTTCTTCGG

20

配列番号 : 36

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 21

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TTTCTTTCAC TGGGCTGAAGT C

21

配列番号 : 37

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCTGAAGA CGGACGTCTG

20

配列番号：38

配列の型：核酸

配列の長さ：27

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

27

配列番号：39

配列の型：核酸

配列の長さ：27

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTGGGGTGGG GAGAGGAGGT AGATTGC

27

配列番号：40

配列の型：核酸

配列の長さ：23

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC

23

配列番号：41

配列の型：核酸

配列の長さ：27

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCACATCACC AAGTGGGCTG CCTACTC

27

配列番号：42

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGAGTTTGG TTACAGCTGG

20

配列番号：43

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATCTAATGC AGCTCGCCTG

20

配列番号：44

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGTCTTGCTG GGAACAAAGA

20

配列番号：45

配列の型：核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TCAC TTTAGA AGGGGCACAT

20

配列番号 : 46

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ACTG TTACTA CTTCTGATGC

20

配列番号 : 47

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TCTG ATGGTC CCACAGTCTG

20

配列番号 : 48

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GTTG TTTCGC AGCCAGGGAT

20

配列番号 : 49

配列の型 : 核酸

配列の長さ : 20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGAGCATCG TTGGGGGTTC

20

配列番号：50

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCATCTCT GTAGAGTGTC

20

配列番号：51

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TAGGGAGAAG GATCAGAGCG

20

配列番号：52

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCCTCCTTG ACAATGTCTG

20

配列番号：53

配列の型：核酸

配列の長さ：18

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTTCATCATC TACAGCCAGT

20

配列番号：54

配列の型：核酸

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGACACCCCTC ACTATTGAGC

20

【図面の簡単な説明】

【図1】

「32-8-1」と「AF00168」の配列の比較を示す図である。

【図2】

「32-8-1遺伝子」のノーザンプロット解析の結果を示す図である。

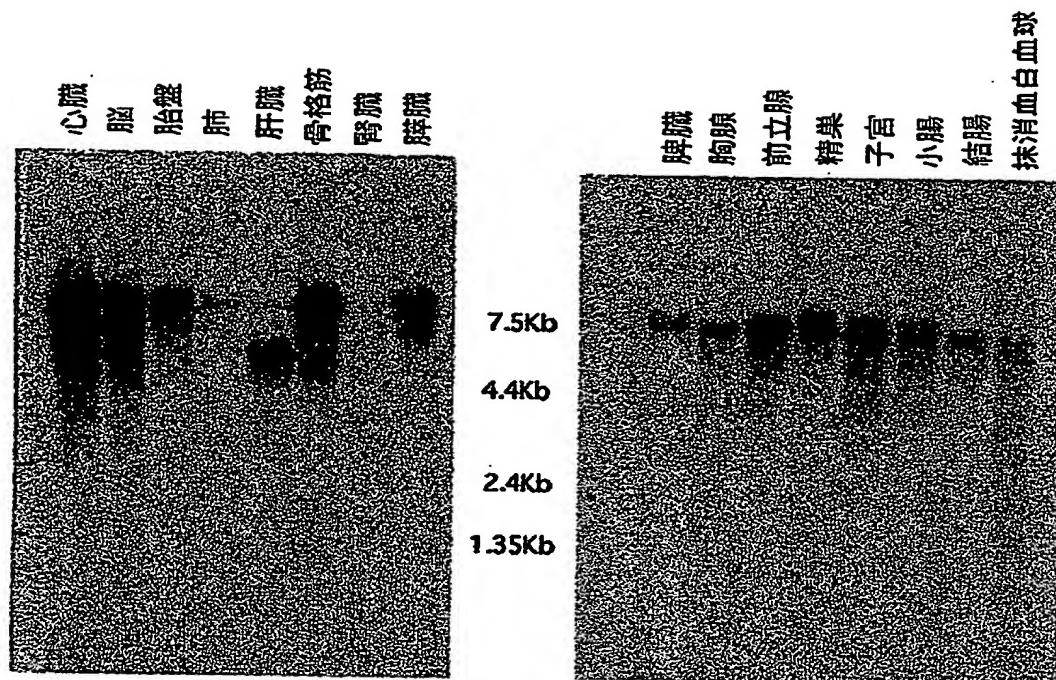
【書類名】

図面

【図 1】

		1	50
32-8-1 AF000168	<u>MGSNHTQSSA SKISQDVKE DEFGYSWKNI RERYGTLTGE LHMIELEKGH</u>		
		51	100
32-8-1 AF000168	<u>SGLGLSLAGN KDRSRMSVFI VGIDPNGAAG KDGRQLQIADE LLEINGQILY</u>		
		101	150
32-8-1 AF000168	<u>GRSHQNASSI IKCAPSKVKI IFIRNKDAVN QMAVCPGNAN EPLPSNSEL</u>		
		151	200
32-8-1 AF000168	<u>QNKEPEPTVT TSDAAVDLSS FKNVQHLELP KDQGGLGIAI SEEDTLSGVI</u>		
		201	250
32-8-1 AF000168	<u>IKSLSTEHGVA ATDGRKVGD QILAVDDEIV VGYPPIEKFIS LLKTAKMTVK</u>		
			NFIS LLKTAKATVK
		251	300
32-8-1 AF000168	<u>LTIHAENPDS QAVPSAAGAA SGEKKNSSQS LMVPQSGSPE PESIRNTSRS</u>		
		LIVRAENPAC PAVPSSAVTV SGERKDNSQT PAVP...APD LEPIPSTSRS	
		301	350
32-8-1 AF000168	<u>STPAIFASDP ATCPIIPGCE TTIEISKGRG GLGLSIVGGS DTLLGAFIIH</u>		
		STPAVFASDP ATCPIIPGCE TTIGVSKGQT GLGLSIVGGS DTLLGAIHH	
		351	400
32-8-1 AF000168	<u>EVYEEGAACK DGRLWAGDQI LEVNGIDLK ATHDEAINVL RQTPQRVRLT</u>		
		EVYEEGAACK DGRLWAGDQI LEVNGIDLK ATHDEAINVL RQTPQRVRVT	
		401	450
32-8-1 AF000168	<u>LYRDEAPYKE EEVCDTLTIE ..LQKKPGKG LGLSIVGKRN DTGVFVSDIV</u>		
		LYRDEAPYKE EDVCDTFTIE LQLQKRPKG LGLSIVGKRN DTGVFVSDIV	
		451	500
32-8-1 AF000168	<u>KGGIADPDGR LIQGDQILLV NGEDVRNASQ EAVAALLKCS LGTVTLEVGR</u>		
		KGGIADADGR LMQGDQILMV NGEDVRHATQ EAVAALLKCS LGAVTLEVGR	
		501	550
32-8-1 AF000168	<u>IKAGPFHISER RPSQTSQLSE GSLSSFTPPL SGSSTSESLE SSSKKNALAS</u>		
		VKAAPFHISER RPSQSSQVSE SSLSSFTPPL SGINTSESLE SNSKKNALAS	
		551	600
32-8-1 AF000168	<u>EIQGLRTVEM KKGPDSLGI SIAGGVGSPL GDVPIFIAMM HPTGVAQTQ</u>		
		EIQRLRTVEI KKGPADSLGL SIAGGVGSPL GDVPIFIAMM HPNGVAQTQ	
		601	650
32-8-1 AF000168	<u>KLRVGDRIVT ICGTSTEGMT HTQAVNLLKN ASGSIEMQVV AGGDVSVTG</u>		
		KLRVGDRIVT ICGTSTDGMT HTQAVNLMKN ASGSIEVQVV AGGDVSVTG	
		651	700
32-8-1 AF000168	<u>HHQEPEASSL SFTGLTSSI FQDDLGPPQC KSITLERGPD GLGFSIVGGY</u>		
		HQQELANPCL AFTGLTSSSI FPDDLGPPQS KTITLDRGPD GLGFSIVGGY	
		701	750
32-8-1 AF000168	<u>GSPHGDLPY VKTVFAKGAA SEDGRLKRGD QIIAVNGQL EGVTHEEAVA</u>		
		GSPHGDLPY VKTVFAKGAA AEDGRLKRGD QIIAVNGQL EGVTHEEAVA	
		751 765	
32-8-1 AF000168	<u>ILKRTKGTVT LMVLS</u>		
		ILKRTKGTVT LMVLS	

【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 PDZドメインを有する新規なタンパク質、および該タンパク質をコードするDNAを提供することを課題とする。

【解決手段】 ヒト臍帯血管内皮細胞のTNF $\alpha$ による遺伝子発現の変化を解析していく過程において、TNFアルファの刺激により発現が上昇した遺伝子を単離し、該遺伝子をプローブとしてスクリーニングを行ったところ、新規なタンパク質をコードする遺伝子を単離するに至った。単離した遺伝子がコードするタンパク質につき解析を行ったところ、該タンパク質はこれまで報告のない新規なタンパク質であり、その分子内にタンパク質-タンパク質相互作用に重要な役割を果たしているPDZドメインを6つ有していることを見出した。

【選択図】 図1

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 596102791  
【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 153 番地 2  
【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代理人】

【識別番号】 100102978  
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階  
【氏名又は名称】 清水国際特許事務所  
【氏名又は名称】 清水 初志

出願人履歴情報

識別番号 [596102791]

1. 変更年月日 1996年 7月15日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県新治郡新治村永井153番地2  
氏 名 株式会社中外分子医学研究所